

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT05/000088

International filing date: 17 February 2005 (17.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: RM2004A000098
Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

1705/88



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

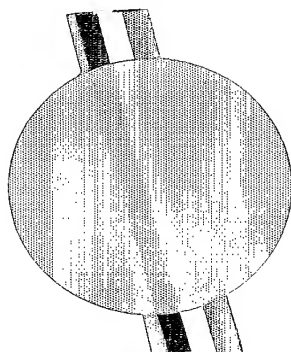
Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2004 A 000098**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li..... 4 APR. 2005



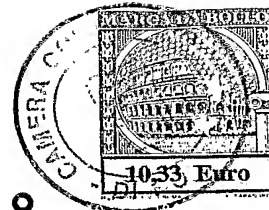
IL FUNZIONARIO
Ing. Giovanni de Sanctis
[Signature]

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

RM 2004 A 000098



A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 02133971008
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA ORAZIO RAIMONDO 18 - 00173 ROMA, RM		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2		COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO				
	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	B3			
C. TITOLO				
C1 Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.				



D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	SPAGNOLI LUIGI GIUSTO
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	BONANNO ELENA
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	PUCCI SABINA
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	PICHIORRI FLAVIA
NAZIONALITA'	D2	

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1		E2		E3
			E4	
				E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI

G1	
----	--

FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

L'AVE SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME:	I1	453 BANCHETTI MARINA; 962B GITTO SERENA; 456 IANNONE CARLO LUIGI; 1012B SANTI FILIPPO; 963B SCILLETTA ANDREA; 171 TALIERCIO ANTONIO; 376 ZANARDO GIOVANNI;
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
INDIRIZZO	I3	Via Piemonte 26
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	I4	00187 Roma
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	LETTERA D'INCARICO: RISERVA

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N.ES.ALL.	N.ES.RIS.	N.PAG.PER ESEMPLARE
PROSPETTO A. DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	1		44
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN ILLUSTRAZIONE. 2 ESEMPLARI)	1		2
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	1		
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	SI
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE			
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESELETTI)	A	D	X	F	
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	SI				
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)	NO				
DATA DI COMPILAZIONE	25/02/2004				

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	RM 2004 A 000098		
C.C.I.A.A. DI	ROMA		COD. 58
IN DATA	25/02/2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	01	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE L'Ufficiale Rogante Vanessa Di Bartolomeo		



FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

RM 2004 A 000098

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

FOGLIO AGGIUNTIVO N. 1

DI TOTALI: 1

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1	CITRO GENNARO
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	

F. PRIORITA'

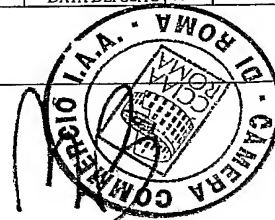
DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)



PROSPETTO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA

RM 2000

4 A 000098

DATA DI DEPOSITO:

25 Febbraio 2004

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Via Orazio Raimondo, 18 - 00173 Roma (RM), ITALIA

C. TITOLO

"Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi".

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

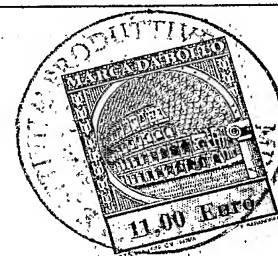
SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

L'invenzione concerne anticorpi oligoclonali anticlasterina in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica epitopi antigenici delle isoforme della clasterina da impiegare nella diagnosi di neoplasie e nella predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.

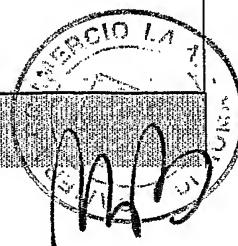
P. DISEGNO PRINCIPALE



FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Serena Gitto

UN MANDATARIO
per sé e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)



RM 2004 A 000098

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Anticorpi oligoclonali anticlausterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi"

Titolare: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Inventori: Luigi Giusto SPAGNOLI, Elena BONANNO, Sabina PUCCI, Flavia PICHIORRI, Gennaro CITRO

* * *

La presente invenzione concerne anticorpi oligoclonali anticlausterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.

Più in particolare, l'invenzione si riferisce ad anticorpi oligoclonali anticlausterina selettivi e specifici per la diagnosi di insorgenza o di recidiva di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità quali, ad esempio, il carcinoma al colon-retto e alla mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

Attualmente, il cancro del grosso intestino è la neoplasia maligna seconda per incidenza e

RECEIVED
MAY 19 1984
FBI - NEW YORK

mortalità solo al tumore del polmone negli uomini e al cancro della mammella nelle donne nei paesi occidentali.

Nel nostro paese si registra un'incidenza di circa 40 nuovi casi ogni 100.000 abitanti (circa 30.000 nuovi casi per anno) ed una mortalità stimata attorno ai 18.000 decessi ogni anno.

Il picco d'incidenza per fascia d'età della neoplasia si osserva mediamente tra la sesta e la settima decade di vita, mentre la sopravvivenza media a cinque anni si colloca attualmente intorno al 60%.

La ragione fondamentale della bassa percentuale di guarigione sta nel fatto che, al momento della resezione del tumore primitivo, una quota significativa di pazienti ha già sviluppato micrometastasi principalmente a livello epatico.

Appare quindi di grande importanza la disponibilità di metodiche di screening precoce. Attualmente, i protocolli di diagnosi precoce (prevenzione secondaria) consistono nella esplorazione rettale, nella determinazione del sangue occulto nelle feci, nella rettosigmoidoscopia o pancolonscopia, periodicamente attuati su soggetti con età media superiore ai quarantacinque anni e asintomatici. La pancolonscopia eseguita

SECRET

La possibilità di ottenere informazioni aggiuntive sulle alterazioni molecolari di una neoplasia presenta il vantaggio irrinunciabile rappresentato dal fatto di poter stratificare il gruppo di pazienti affetti dalla neoplasia in sottogruppi di prognosi differente e quindi indirizzarli verso protocolli terapeutici più adeguati. Inoltre, la stessa alterazione molecolare può rappresentare il target di una terapia mirata, permettendo di rivoluzionare radicalmente la terapia farmacologica del cancro.

Studi recenti hanno dimostrato un aumento dell'espressione di clasterina nel tumore della mammella (Redondo et al, 2000), suggerendo un suo probabile ruolo nella progressione tumorale.

La clasterina è una glicoproteina eterodimerica (catene α e β) ubiquitaria implicata in diversi processi fisiologici e nel controllo della

1954
1953
1952
1951
1950
1949
1948
1947
1946
1945
1944
1943
1942
1941
1940
1939
1938
1937
1936
1935
1934
1933
1932
1931
1930
1929
1928
1927
1926
1925
1924
1923
1922
1921
1920
1919
1918
1917
1916
1915
1914
1913
1912
1911
1910
1909
1908
1907
1906
1905
1904
1903
1902
1901
1900
1899
1898
1897
1896
1895
1894
1893
1892
1891
1890
1889
1888
1887
1886
1885
1884
1883
1882
1881
1880
1879
1878
1877
1876
1875
1874
1873
1872
1871
1870
1869
1868
1867
1866
1865
1864
1863
1862
1861
1860
1859
1858
1857
1856
1855
1854
1853
1852
1851
1850
1849
1848
1847
1846
1845
1844
1843
1842
1841
1840
1839
1838
1837
1836
1835
1834
1833
1832
1831
1830
1829
1828
1827
1826
1825
1824
1823
1822
1821
1820
1819
1818
1817
1816
1815
1814
1813
1812
1811
1810
1809
1808
1807
1806
1805
1804
1803
1802
1801
1800
1799
1798
1797
1796
1795
1794
1793
1792
1791
1790
1789
1788
1787
1786
1785
1784
1783
1782
1781
1780
1779
1778
1777
1776
1775
1774
1773
1772
1771
1770
1769
1768
1767
1766
1765
1764
1763
1762
1761
1760
1759
1758
1757
1756
1755
1754
1753
1752
1751
1750
1749
1748
1747
1746
1745
1744
1743
1742
1741
1740
1739
1738
1737
1736
1735
1734
1733
1732
1731
1730
1729
1728
1727
1726
1725
1724
1723
1722
1721
1720
1719
1718
1717
1716
1715
1714
1713
1712
1711
1710
1709
1708
1707
1706
1705
1704
1703
1702
1701
1700
1699
1698
1697
1696
1695
1694
1693
1692
1691
1690
1689
1688
1687
1686
1685
1684
1683
1682
1681
1680
1679
1678
1677
1676
1675
1674
1673
1672
1671
1670
1669
1668
1667
1666
1665
1664
1663
1662
1661
1660
1659
1658
1657
1656
1655
1654
1653
1652
1651
1650
1649
1648
1647
1646
1645
1644
1643
1642
1641
1640
1639
1638
1637
1636
1635
1634
1633
1632
1631
1630
1629
1628
1627
1626
1625
1624
1623
1622
1621
1620
1619
1618
1617
1616
1615
1614
1613
1612
1611
1610
1609
1608
1607
1606
1605
1604
1603
1602
1601
1600
1599
1598
1597
1596
1595
1594
1593
1592
1591
1590
1589
1588
1587
1586
1585
1584
1583
1582
1581
1580
1579
1578
1577
1576
1575
1574
1573
1572
1571
1570
1569
1568
1567
1566
1565
1564
1563
1562
1561
1560
1559
1558
1557
1556
1555
1554
1553
1552
1551
1550
1549
1548
1547
1546
1545
1544
1543
1542
1541
1540
1539
1538
1537
1536
1535
1534
1533
1532
1531
1530
1529
1528
1527
1526
1525
1524
1523
1522
1521
1520
1519
1518
1517
1516
1515
1514
1513
1512
1511
1510
1509
1508
1507
1506
1505
1504
1503
1502
1501
1500
1499
1498
1497
1496
1495
1494
1493
1492
1491
1490
1489
1488
1487
1486
1485
1484
1483
1482
1481
1480
1479
1478
1477
1476
1475
1474
1473
1472
1471
1470
1469
1468
1467
1466
1465
1464
1463
1462
1461
1460
1459
1458
1457
1456
1455
1454
1453
1452
1451
1450
1449
1448
1447
1446
1445
1444
1443
1442
1441
1440
1439
1438
1437
1436
1435
1434
1433
1432
1431
1430
1429
1428
1427
1426
1425
1424
1423
1422
1421
1420
1419
1418
1417
1416
1415
1414
1413
1412
1411
1410
1409
1408
1407
1406
1405
1404
1403
1402
1401
1400
1399
1398
1397
1396
1395
1394
1393
1392
1391
1390
1389
1388
1387
1386
1385
1384
1383
1382
1381
1380
1379
1378
1377
1376
1375
1374
1373
1372
1371
1370
1369
1368
1367
1366
1365
1364
1363
1362
1361
1360
1359
1358
1357
1356
1355
1354
1353
1352
1351
1350
1349
1348
1347
1346
1345
1344
1343
1342
1341
1340
1339
1338
1337
1336
1335
1334
1333
1332
1331
1330
1329
1328
1327
1326
1325
1324
1323
1322
1321
1320
1319
1318
1317
1316
1315
1314
1313
1312
1311
1310
1309
1308
1307
1306
1305
1304
1303
1302
1301
1300
1299
1298
1297
1296
1295
1294
1293
1292
1291
1290
1289
1288
1287
1286
1285
1284
1283
1282
1281
1280
1279
1278
1277
1276
1275
1274
1273
12

proliferazione cellulare (Murphy et al, 1988; Aronow et al., 1993; Fratelli et al., 1996; Ho et al., 1998; Humphreys et al., 1999; O'Sullivan et al., 2003; Zhou et al., 2002; Bettuzzi et al., 2002). Sono state caratterizzate diverse isoforme che differiscono per il grado di glicosilazione e per la funzione mediata.

Gli autori della presente invenzione in un lavoro recentemente pubblicato (Pucci et al., 2004) hanno studiato l'espressione della clasterina al fine di delucidare il suo ruolo nella progressione tumorale ed in particolare nella sequenza adenoma-carcinoma del colon-retto, uno dei modelli di tumorigenesi più studiati e meglio definiti nell'uomo. In questo contesto, l'osservazione di 35 campioni di mucosa intestinale umana, quali biopsie endoscopiche e prelievi chirurgici, ha dimostrato la presenza di una modulazione delle differenti isoforme di clasterina nei differenti compartimenti cellulari, direttamente correlata alla progressione tumorale. Infatti, è stata riscontrata la presenza di clasterina a localizzazione esclusivamente nucleare con la funzione di regolazione della progressione del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi nella mucosa sana del colon. Invece, nel processo di



cancerizzazione e di progressione della neoplasia sono stati osservati un marcato aumento di espressione della proteina esclusivamente nel citoplasma e assenza dell'isoforma nucleare.

Le evidenze concernenti la localizzazione hanno permesso di riconoscere due principali isoforme: una isoforma nucleare non glicosilata presente nella mucosa sana e negli adenomi; una isoforma citoplasmatica glicosilata assente nella mucosa sana ed altamente espressa nel citoplasma delle cellule neoplastiche. Tali risultati concernenti la modulazione di differenti isoforme di clasterina nella tumorigenesi del colon-retto chiariscono i dati controversi sull'aumento di clasterina descritto nelle neoplasie e sul ruolo della proteina nell'induzione dell'apoptosi, suggerendo un possibile ruolo della clasterina come potenziale nuovo marcatore di insorgenza e di prognosi del cancro del colon-retto.

L'impiego della clasterina come indice diagnostico di certe condizioni fisio-patologiche, quali, ad esempio, il diabete mellito di tipo II ed alcune patologie coronariche è stato già descritto nella domanda di brevetto greco GR 20020100196. Il documento greco descrive un metodo ELISA che si

avvale di due anticorpi disponibili commercialmente (uno dei quali è coniugato con l'enzima HRP) per la misurazione quantitativa dei livelli di ApoJ sierica correlati alle condizioni patologiche summenzionate. In particolare, nel documento l'unico riferimento a patologie tumorali riguarda la citazione di un precedente tentativo non soddisfacente di misurazione mediante ELISA di ApoJ nel sangue dei pazienti affetti da carcinoma alla prostata (Morrissey et al., 2001).

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di nuovi mezzi e metodi per la diagnosi e la predizione del grado di malignità e della stadiazione clinica di alcune neoplasie, in particolare del colon-retto, che consentano di superare i limiti delle metodiche invasive attualmente impiegate.

Gli autori della presente invenzione hanno ora evidenziato che la comparsa ed il progressivo aumento dell'isoforma citoplasmatica della clasterina nelle neoplasie è correlata ad un significativo incremento di clasterina nel siero dei pazienti affetti da patologie tumorali ed, in particolare, da carcinoma del colon-retto.

Sulla base di questa osservazione, gli autori hanno messo a punto un nuovo metodo di immunodosaggio della clasterina mediante anticorpi in grado di riconoscere in maniera specifica e selettiva le due isoforme di clasterina, citoplasmatica e nucleare, per la diagnosi di quelle alterazioni molecolari che nell'ambito dello studio dei tumori consentono di definire la prognosi e dare indicazioni terapeutiche.

Infatti, come precedentemente descritto, la scomparsa dell'isoforma nucleare di clasterina non glicosilata e l'espressione preferenziale di una seconda isoforma totalmente glicosilata e citoplasmatica sembrano essere direttamente correlate all'aggressività del tumore e al suo potenziale metastatico (Pucci et al., 2004).

In particolare, detto metodo di dosaggio delle due isoforme di clasterina citoplasmatica e nucleare mediante gli anticorpi secondo la presente invenzione oltre a rappresentare un mezzo non invasivo, semplice ed economico per il follow-up dei pazienti consente di formulare un indice di aggressività biologica della neoplasia consentendo quindi una standardizzazione di detto metodo. In particolare, gli autori hanno messo a punto una curva standard in cui la proteina di riferimento non consiste nella

forma purificata della proteina clasterina ma nel peptide sintetizzato in base al nuovo epitopo scelto per l'immunizzazione.

Le tecniche sierologiche ad oggi utilizzate, ELISA e/o immunofluorescenza, richiedono l'impiego di anticorpi monoclonali per la difficoltà di ottenere sieri specifici.

Gli autori della presente invenzione hanno ora ottenuto sieri specifici contenenti anticorpi oligoclonali specifici e selettivi per determinati epitopi appartenenti alle isoforme di clasterina, citoplasmatica e nucleare. Questi anticorpi oligoclonali non presentano gli svantaggi in termini di riproducibilità, costi di produzione e conservazione tipici degli anticorpi monoclonali ottenuti a partire da un ibridoma. Infatti, la selezione e la conservazione di un ibridoma presenta numerosi limiti: la bassa riproducibilità del clone e della specificità anticorpale verso l'epitopo, la difficoltà tecnica per la produzione dell'ibridoma, il costo elevato per il mantenimento e la difficile conservazione di campioni inalterati nel tempo.

Inoltre, la procedura di produzione degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione si basa sulla scelta di epitopi antigenici molto piccoli



RECEIVED
1984
JAN 10 10 10 AM
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION
U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE

sintetizzati su fase solida che consente di determinare un repertorio ristretto di anticorpi assimilabile ad un anticorpo monoclonale per quanto concerne le caratteristiche di specificità e affinità. Per una maggiore facilità di impiego degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione, le sequenze degli epitopi antigeniche sono state scelte tra quelle altamente conservate anche nel modello murino (90%) che consentono un più vasto campo applicativo con estensione d'uso anche nei modelli animali utilizzati per la ricerca e tali da minimizzare il legame aspecifico con le altre proteine umane diverse dalla clasterina. In aggiunta, la scelta di detti epitopi è stata condotta dagli autori della presente invenzione sia per garantire la massima specificità ed efficienza e la minima cross-reattività dell'anticorpo oligoclonale con le diverse isoforme glicosilate della clasterina citoplasmatica, sia per ottenere anticorpi altamente specifici e selettivi per l'isoforma nucleare non glicosilata.

E' da evidenziare il fatto che gli anticorpi anticlasterina in commercio non sono in grado di identificare detta isoforma nucleare perché l'immunizzazione eseguita per la loro preparazione avviene somministrando le proteine purificate dal

siero, che gli stessi autori hanno recentemente dimostrato contenere esclusivamente l'isoforma glicosilata della proteina.

Nel caso specifico dello studio condotto sul carcinoma del colon-retto, gli autori della presente invenzione hanno trovato che l'isoforma di clasterina citoplasmatica secreta viene rilasciata nello spazio extracellulare e nel lume dell'intestino per cui è previsto un incremento della proteina anche nelle feci dei pazienti affetti dalla patologia. Quindi, il dosaggio di clasterina può essere effettuato, oltre che nel sangue periferico, nelle feci anche con un test crociato sangue-feci altamente specifico per il carcinoma del colon-retto. In tal modo si elimina il problema dell'eventuale interferenza di incrementi dei livelli di clasterina dovuti ad altre neoplasie (neoplasie alla mammella, prostata, testicolo, ovaio, sistema nervoso centrale, sistema emolinfopoietico).

Formano pertanto oggetto della presente invenzione anticorpi oligoclonali in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica l'epitopo antigenico di almeno un'isoforma di clasterina, detto epitopo essendo caratterizzato da una lunghezza della sequenza amminoacidica compresa tra 10 e 20 amminoacidi. Detta almeno un'isoforma,

che gli anticorpi oligoclonali anticlasterina sono in grado di riconoscere e legare, può essere l'isoforma della clasterina citoplasmatica glicosilata o l'isoforma della clasterina nucleare non glicosilata. In questo senso gli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione sono in grado di discriminare tra le diverse isoforme di clasterina esistenti.

Più in particolare, l'epitopo antigenico scelto per generare detti anticorpi oligoclonali contro l'isoforma nucleare non glicosilata della clasterina può comprendere una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

L'epitopo antigenico scelto per generare detti anticorpi oligoclonali contro l'isoforma citoplasmatica glicosilata della clasterina può comprendere una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);



METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

Gli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione possono essere marcati, preferibilmente con un fluorocromo, un isotopo radioattivo, un enzima, biotina o una sostanza chemioluminescente.

In particolare, il fluorocromo può essere la fluoresceina, la ficoeritrina, la rodamina, il texas red, la cumarina; l'enzima può essere la perossidasi di rafano (HRP), la fosfatasi alcalina; l'isotopo radioattivo può essere il ^{14}C o il ^3H ; la sostanza chemioluminescente può essere la luciferina.

Costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione epitopi antigenici appartenenti ad almeno un'isoforma della clasterina, citoplasmatica e/o nucleare, comprendente almeno una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato da un metodo per la preparazione degli anticorpi oligoclonali, come definiti precedentemente, comprendente le seguenti fasi:

- a) sintesi in fase solida di almeno uno degli epitopi antigenici come sopra definiti;
- b) coniugazione di detto almeno un epitopo antigenico con un carrier proteico atto a rendere immunogeno detto epitopo, preferibilmente albumina di siero bovina;
- c) immunizzazione dell'animale con detto epitopo reso immunogeno, in adiuvante di Freund completo;
- d) prelievo del siero da detto animale, preferibilmente dal coniglio, e purificazione degli anticorpi oligoclonali, ad esempio, mediante cromatografia di affinità.

Forma ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo immunologico per la rivelazione dei livelli di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del

loro grado di malignità comprendente le seguenti fasi:

- a) estrazione delle proteine da detto campione biologico, quale , ad esempio, sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor;
- b) incubazione in opportune condizioni di detto estratto proteico con almeno un anticorpo oligoclonale come sopra descritto, in maniera da formare un complesso antigene-anticorpo; e
- c) rivelazione qualitativa e quantitativa di detto complesso antigene-anticorpo.

Più in particolare, il metodo immunologico secondo la presente invenzione consente la diagnosi di neoplasie quali, ad esempio, carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

La rivelazione della fase c) può essere eseguita mediante almeno una delle tecniche scelte dal gruppo che consiste in ELISA, Western Blot, RIA, immunoistochimica rivelata con fluorocromi (immunofluorescenza) o con metodo enzimatico, o mediante una combinazione di dette tecniche.

Costituisce ulteriore oggetto della presente

invenzione un kit diagnostico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente almeno uno degli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione. Le neoplasie che possono essere diagnosticate sono, ad esempio, il carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

Infine, un ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato dall'uso di almeno uno degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione, per la determinazione qualitativa e quantitativa dei livelli di almeno un'isoforma di clasterina in un campione biologico quale, ad esempio, sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor, per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità quali, ad esempio, carcinoma del colon-retto e della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

La determinazione qualitativa e quantitativa può essere effettuata mediante almeno una tecnica scelta dal gruppo che consiste in ELISA, RIA,

immunoistochimica rilevata con fluorocromi (immunofluorescenza) o con metodo enzimatico, Western Blot o mediante una combinazione di esse.

Per maggiore chiarezza il termine "anticorpi oligoclonali" indica un repertorio ristretto di anticorpi policlonali ottenuti in seguito ad un determinato numero di cicli di immunizzazione al termine del quale si otterranno delle caratteristiche di affinità e specificità assimilabili a quelle di un anticorpo monoclonale.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra i risultati del saggio Western Blot di identificazione della clasterina nucleare; nel pannello A l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico non glicosilato della catena α della clasterina, SEQ ID No 1; nel pannello B l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico non glicosilato della catena β della clasterina, SEQ ID No 2;

la figura 2 mostra i risultati del saggio Western Blot di identificazione della clasterina citoplasmatica glicosilata; nel pannello A



l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico glicosilato della catena β della clasterina, SEQ ID No 2; nel pannello B l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico della catena β della clasterina, SEQ ID No 3; nel pannello C l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico della catena α della clasterina, SEQ ID No 4;

la figura 3 mostra i risultati del saggio ELISA per l'identificazione della clasterina secreta e nucleare nel tessuto tumorale e nella corrispondente parte sana; nel pannello A è mostrata la rilevazione ottenuta mediante l'anticorpo specifico per la clasterina nucleare non glicosilata, diretto contro l'epitopo antigenico SEQ ID No 1; nel pannello B è mostrata la rilevazione ottenuta mediante l'anticorpo specifico per la clasterina secreta glicosilata, diretto contro l'epitopo antigenico SEQ ID No 4;

la figura 4 mostra il diagramma che illustra i risultati del saggio ELISA concernenti la concentrazione di clasterina ($\mu\text{g/ml}$) rilasciata nel soprannatante di coltura dalle cellule della mucosa del colon normale e da cellule neoplastiche in coltura isolate ex vivo (numero di cellule 10×10^7) e dosata mediante saggio ELISA.

ESEMPIO 1: *Produzione degli anticorpi oligoclonali anticlasterina mediante immunizzazione.*

Per la produzione dell'anticorpo oligoclonale specifico anticlasterina è stata impiegata la tecnica dell'immunizzazione nota agli esperti del settore. La procedura consiste nell'immunizzare un coniglio o altro animale con un epitopo caratteristico della proteina target e gli anticorpi prodotti dai differenti cloni di plasmacellule saranno presenti nel siero dell'animale che rappresenta una fonte di anticorpi policlonali.

MATERIALI E METODI

Preparazione immunogeni: sintesi e purificazione

Sono state impiegate sequenze di epitopi antigeniche molto piccole appartenenti alla clasterina sintetizzate su fase solida e di lunghezza compresa tra 10 e 20 amminoacidi.

La sequenza amminoacidica della proteina clasterina umana è stata confrontata con la stessa sequenza murina (*Mus musculus*) e, mediante l'impiego di un algoritmo sviluppato da Kolaskar A. S. e Tongaonkar P.C. (1990) disponibile attraverso il programma Antigenic Peptide Prediction

(www.mifoundation.org), sono stati individuati i siti antigenici delle due sequenze.

Dopo avere individuato le sequenze contenenti un sito antigenico condivise tra uomo e topo (gli anticorpi possono essere così impiegati nel topo e nel ratto), sono state selezionate le sequenze potenzialmente suscettibili a glicosilazione. Sono stati individuati due probabili siti di glicosilazione della proteina che avrebbero determinato la discriminazione tra le due diverse isoforme ed è stata scelta la sequenza più corta per ottenere la massima specificità ed efficienza anticorpale, unitamente alla minima cross-reattività, ovvero il legame con le diverse forme glicosilate della stessa proteina clasterina. Infatti, l'immunizzazione eseguita con epitopi non glicosilati di ridotte dimensioni ha consentito di ottenere anticorpi specifici e selettivi per il riconoscimento della forma nucleare della clasterina (non glicosilata).

L'identificazione delle diverse isoforme della clasterina in un estratto proteico da tessuto tramite Western Blot è stato possibile denaturando la proteina.

Le sequenze amminoacidiche, selezionate e identificate, sono le seguenti: QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1), che rappresenta un peptide antigenico non glicosilato della catena α utilizzato per l'identificazione della forma nucleare della clasterina; TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2), che rappresenta il peptide antigenico non glicosilato appartenente alla catena β utilizzato per la produzione del secondo anticorpo per l'identificazione della forma nucleare comprendente anche il sito di glicosilazione 103 (sottolineato).

Detti peptidi sono stati resi immunogeni coniugandoli con una proteina carrier, in particolare con l'albumina sierica bovina (BSA), comunemente impiegata per la sua stabilità e solubilità nel plasma. Per la coniugazione è stato impiegato un kit commerciale "Imject®Immunogen EDC Conjugation kit" della Pierce (Rockford, IL, US) secondo le istruzioni del produttore.

Il modello animale è stato determinato dall'alta omologia e conservazione della sequenza interspecie.

Sono stati scelti tre epitopi per l'immunizzazione dei conigli a causa della scarsa immunogenicità dell'antigene, nonostante la



11.00 Euro

coniugazione con BSA e la somministrazione in adiuvante di Freund completo. Più specificatamente, sono stati impiegati i seguenti tre epitopi : TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2) che rappresenta il peptide antigenico glicosilato appartenente alla catena β utilizzato per la produzione del secondo anticorpo per l'identificazione della forma nucleare comprendente anche il sito di glicosilazione 103 (sottolineato); TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3) che rappresenta il peptide appartenente alla catena β utilizzato per l'identificazione della forma citoplasmatica; METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4) che rappresenta il peptide antigenico appartenente alla catena α utilizzato per l'identificazione della forma citoplasmatica.

Sono stati inoculati 150 μ l di ciascuna delle soluzioni di immunogeno così ottenute contenenti il coniugato epitopo antigenico-proteina carrier per via sottocutanea sul dorso del coniglio in adiuvante Freund completo. Sono stati immunizzati tre conigli per peptide con peptidi semplici o glicosilati sintetizzati in fase solida; i conigli sono stati immunizzati secondo la tabella suggerita da Corning Hazleton Virginia (Vienna, VA). In particolare i due siti di glicosilazione scelti come epitopi per la

produzione degli anticorpi sono stati inoculati nel coniglio sia individualmente, sia in miscela in un rapporto stechiometrico 1:1.

Quindi è stata effettuata l'immunizzazione con un epitopo appartenente alla catena β della clasterina che non presenta siti di glicosilazione per ottenere anticorpi in grado di riconoscere tutte le isoforme.

L'utilizzo di siti di glicosilazione della proteina ha permesso di discriminare sia in Western Blot sia in ELISA l'isoforma citoplasmatica marcatore dell'aggressività tumorale e del suo relativo potenziale metastatico.

Dopo sette giorni dalla prima somministrazione dei peptidi immunogeni l'operazione è stata ripetuta negli stessi animali per sostenere e aumentare la specificità della risposta immune. L'operazione è stata poi ripetuta ogni sette giorni per un totale di sei volte.

La risposta immune è stata monitorata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione attraverso la tecnica dell'ELISA capace di misurare l'entità della risposta anticorpale nel siero del coniglio. Il siero del coniglio è stato ottenuto tramite il prelievo di 5 ml di sangue dalla vena auricolare dell'animale.

Come bianco per il test ELISA è stato utilizzato il siero preimmune del coniglio, prelevato antecedentemente alla prima immunizzazione.

Il sangue è stato raccolto dopo la quarta, quinta e sesta immunizzazione per il test di affinità e specificità.

Dopo la quinta e la sesta immunizzazione gli anticorpi presenti nei sieri dei conigli sono stati precipitati con una soluzione satura di ammonio solfato e quindi purificate tramite cromatografia per affinità sfruttando il legame tra Proteina A immobilizzata su biglie di agarosio (SIGMA) e le IgG presenti nell'antisiero. Le IgG presenti sono state eluite con un tampone 0,05 M Na_2HPO_4 , 0,025 M acido citrico a pH 3.

Screening anti-sieri e test di specificità

La risposta immune è stata monitorata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione tramite ELISA.

Il sangue per il test e per la produzione di anticorpi proveniente da tre conigli diversi è stato valutato per l'idoneità al saggio ELISA accertando il titolo di antisiero a varie diluizioni nel range di massimo legame del dosaggio, la sensibilità e la specificità. Dopo la sesta immunizzazione sono stati condotti i test illustrati di seguito.



Per i test di legame a varie diluizioni, i diversi anticorpi sono stati incubati sia con terreno di coltura completo di controllo sia con terreno addizionato di siero in presenza di quantità note di peptide. Su un grafico è stata riportata la percentuale di peptide legato contro la diluizione dell'antisiero. E' stata stimata la diluizione dell'antisiero che legava tra il 30 e il 40% del peptide totale aggiunto.

Utilizzando l'antisiero alla diluizione appropriata è stata dosata una curva standard di riferimento che si estendeva da 0,03 a 300000 ng/ml per stimare la sensibilità.

E' stata testata la cross-reattività con altre lipoproteine: ApoE, Apo AI e della proteina di trasporto dell'immunogeno (BSA) alle concentrazioni comprese tra 0,50 a 300000 ng/ml.

La percentuale di cross-reattività è stata calcolata dal rapporto molare o di massa della concentrazione stimata al 50% di peptide clasterina rispetto a quella del composto del test. I risultati sono mostrati nella tabella 1.

Tabella 1

	Anticorpo SEQ ID No 1	Anticorpo SEQ ID No 2	Anticorpo SEQ ID No 2	Anticorpo SEQ ID No 3	Anticorpo SEQ ID No 4
Clasterina	100	100	100	100	100
ApoAI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,004	<0,006
ApoE	<0,001	<0,002	<0,008	<0,002	<0,003
BSA	<0,009	<0,008	<0,01	<0,007	<0,01

Sono stati scelti quindi gli antisieri con più alto titolo e minore cross-reattività.

Gli anticorpi oligoclonali individuati dopo i sei cicli di immunizzazione hanno consentito di poter studiare i profili di espressione della proteina clasterina in estratti proteici provenienti da biopsie di tessuti sia umani sia murini.

Lo studio dell'espressione in lisati contenenti estratti proteici da tessuti umani e murini ha consentito di analizzare l'espressione della proteina sia qualitativamente sia quantitativamente.

Tramite la tecnica nota del Western Blot (diluizione 1:1000), l'anticorpo oligoclonale è capace di riconoscere la proteina clasterina/apoJ nucleare con un'affinità quasi esclusiva per questa

isoforma. Infatti, vengono identificate una banda di 55 kDa per la proteina nucleare non glicosilata (Burkey et al., 1991; Wong et al., 1993; Lakins et al., 1998; Leskov et al., 2003) e una banda di 80 kDa che rappresenta il precursore non glicosilato (oloproteina) della proteina sia nell'uomo sia nel topo. Ciò dimostra che l'anticorpo non cross-reagisce con altre proteine ed è quindi altamente specifico.

RISULTATI

Per quanto concerne la rilevazione dell'isoforma di clasterina non glicosilata nucleare, gli anticorpi contro gli epitopi SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2 sono stati testati mediante Western Blot denaturante per verificare la capacità di evidenziare, in un lisato proteico, il peso molecolare corrispondente alle diverse isoforme di clasterina.

Infatti, nella mucosa sana del colon, è stata evidenziata la presenza della clasterina nucleare coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare e nell'induzione di apoptosi. E' stato preparato un lisato proteico totale di cellule della mucosa sana del colon. Dopo aver determinato, mediante saggio Bradford, il quantitativo proteico rispetto ad una curva standard (BSA), sono stati

caricati 15 µg di estratto proteico totale in un gel di poliacrilamide denaturante.

Dall'analisi mediante Western Blot i due anticorpi diretti verso la forma non glicosilata hanno mostrato un'alta affinità per la forma nucleare non glicosilata (50-55 kDa).

Nella figura 1 è mostrato il Western Blot di identificazione della clasterina nucleare mediante anticorpi ad alta affinità per l'isoforma non glicosilata ottenuti mediante un booster dopo 5 immunizzazioni in coniglio. Con il termine "booster" si indica la fase di crescita esponenziale della risposta immunologia indotta nell'animale da un antigene.

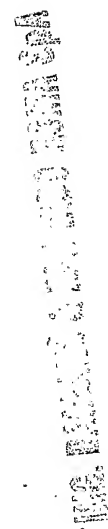
I livelli di espressione di clasterina citoplasmatica sono notevolmente elevati in carcinomi aggressivi e metastatici del colon.

Sono stati preparati estratti proteici totali da tumori del colon provenienti da reperti operatori. In particolare, sono stati analizzati 15 µg di proteine totali mediante Western Blot. I campioni caricati in triplicato sono stati analizzati con i tre anticorpi prodotti verso l'isoforma citoplasmatica glicosilata (epitopi SEQ ID No 2, 3, 4). Nella figura 2 sono mostrate le immagini

dell'analisi mediante Western Blot con ognuno degli anticorpi ottenuti. Come mostrato nella figura, dopo la rilevazione con i diversi anticorpi ad alta affinità, è stata evidenziata una banda a 40 kDa corrispondente al peso molecolare della forma glicosilata della clasterina.

Sono stati eseguiti test di specificità durante l'incubazione con l'anticorpo primario. I singoli peptidi sono stati aggiunti in quantità scalari durante l'incubazione con l'anticorpo primario prodotto. I peptidi sono stati usati per competere per il legame tra la clastrina presente nell'estratto e anticorpo facendo scomparire il segnale del Western Blot, dimostrando la specificità del legame già avvalorata dal riconoscimento della proteina di peso molecolare pari a 40 kDa.

Nella figura 3 è evidenziata la specificità per la diverse isoforme di clasterina e dall'analisi della figura si evince come l'espressione delle diverse isoforme sia modulata durante la tumorigenesi del colon. Nel tessuto tumorale (T) scompare l'isoforma di controllo della proliferazione che è localizzata nel nucleo delle cellule della mucosa sana (S). Al contrario, nel tumore aumenta l'isoforma



citoplasmatica implicata nel rimaneggiamento della membrana e nella motilità cellulare.

Questo tipo di saggio permetterebbe di avere delle informazioni di tipo prognostico per il paziente. Infatti, è stato correlato l'aumento di clasterina citoplasmatica in pazienti affetti da tumori metastatici del colon ad un follow up di recidiva metastatica del tumore.

Tale indagine potrebbe fornire informazioni sulla potenziale formazione di recidive e metastasi del paziente.

ESEMPIO 2: *Metodologia ELISA per la determinazione quali-quantitativa della clasterina nei liquidi biologici*

La determinazione quantitativa nei liquidi biologici (sangue, liquido seminale, urine, feci, liquido pleurico e ascitico, liquor) della clasterina/ApoJ secondo la presente invenzione è stata sviluppata mediante un adattamento delle tecniche ELISA e RIA per neoplasie di piccole dimensioni.

Il metodo ELISA prevede l'uso di due anticorpi diretti contro la proteina clasterina glicosilata secreta nei liquidi biologici ed è applicato con successo per la determinazione quantitativa assoluta

e non relativa anche di minime variazioni di clasterina nei liquidi biologici.

Un miglioramento significativo è stato raggiunto mediante i dosaggi immunologici omogenei, che non richiedono una separazione fisica dell'antigene da quello non legato e quindi facilitano l'automazione e velocizzano lo screening.

La clasterina si trova in individui sani alla concentrazione di 100 ± 42 µg/ml.

Il metodo della presente invenzione prevede un'ulteriore estensione ad un dosaggio RIA che permetta la rivelazione di clasterina presente nei liquidi biologici in relazione alla grandezza della massa tumorale e all'aggressività del tumore; infatti il dosaggio RIA è molto sensibile ed è quindi indicato per valutare le differenze tra i livelli di concentrazione di clasterina normali o lievemente aumentati a causa di neoplasie di piccole dimensioni o non aggressive.

MATERIALI E METODI

Curva standard

Per la costruzione della curva standard ciascun peptide utilizzato per la generazione dei diversi anticorpi è stato legato a molecole di BSA ed

immunoadsorbito in diluizioni scalari in piastre da 96 pozzetti.

Per la curva di standardizzazione è stata utilizzata ciascuna sequenza peptidica, sintetizzata con il metodo a fase solida, usata per la generazione dell'anticorpo oligoclonale anti-clasterina secreta.

La curva di riferimento quantitativa è stata effettuata legando il peptide non marcato ad una molecola carrier di cui si conosce la capacità legante. E' stata quindi utilizzata albumina cationica (tutti i gruppi COOH trasformati in NH_2 , PIERCE). La coniugazione del peptide al carrier avviene con carbodiimmide o glutaraldeide (un NH_2 della proteina con una molecola di peptide).

I gruppi NH_2 possono essere determinati con un metodo colorimetrico. La determinazione degli NH_2 liberi sulla proteina, prima e dopo la coniugazione con il peptide, rende nota la quantità di e molecole di peptide coniugate per mole di carrier.

La curva standard è stata ottenuta con quantità crescenti, da 0 alla quantità saturante l'aliquota di anticorpo impiegata, di composto carrier-peptide in piastra e con quantità costante di anticorpo.

Le reazioni caratterizzate dalla stessa quantità di anticorpo in campioni contenenti la



proteina o il peptide libero daranno un'intensità di reazione che potrà essere riportata sulla curva di riferimento per la quantizzazione.

E' stata quindi preparata la curva standard, necessaria per la determinazione della concentrazione di clasterina nei campioni, piastrando 50 μ l di soluzione per pozzetto in TBS + 0,02% BSA + 0,5 % Tween-20.

ELISA

Nella fase di rivestimento delle piastre l'anticorpo anti-clasterina secondo la presente invenzione contro l'epitopo è stato diluito in un tampone di rivestimento (0,05 M tampone carbonato, pH 9,6) + 0,1% NaN_3 alla concentrazione di 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e lasciato incubare in piastre da 96 pozzetti (50 $\mu\text{l/pozzetto}$) per due ore a 37°C e per una notte a 4°C.

Al termine dell'incubazione l'anticorpo non legato è stato rimosso mediante lavaggio con TBS (Tris Buffered Saline) + 0,5 % Tween 20 ed in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 μl di BSA 1% in tampone di rivestimento per 30 minuti a 37°C.

Le piastre sono state lavate in TBS (Tris Buffered Saline) + 0,5% Tween-20.

I campioni di siero dei pazienti sono stati piastrati in tre diverse diluizioni (50 μ l/pozzetto). Tutti i punti sperimentali sono stati eseguiti in triplicato.

Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C (oppure per una notte a 4°C) ed in seguito lavate in TBS + 0,5 Tween-20.

Un secondo anticorpo anti-clasterina è stato diluito 1:200 in TBS + 0,1% BSA + 0,05% Tween-20 + 2mM di $MgCl_2$; 50 μ l della diluizione sono stati aggiunti in ogni pozzetto e lasciati in incubazione per 4 ore a 37°C. L'anticorpo non legato è stato rimosso mediante lavaggi in TBS + 0,5% Tween-20.

Reazione con gli anticorpi specifici HRP coniugati

Le piastre sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 100 μ l di IgG di pecora anti-coniglio coniugate con la perossidasi di rafano diluite 1:10.000 in 1% BSA/TBS.

Dopo l'incubazione le piastre sono state nuovamente lavate, l'anticorpo è stato visualizzato tramite l'aggiunta di 100 μ l per pozzetto di soluzione di sviluppo e una successiva incubazione per 2 ore al buio a temperatura ambiente; la soluzione di sviluppo è stata preparata combinando 6

μl di H_2O_2 , 360 μl di tetrametilbenzidina (3 mg/ml) dissolta in acetone, 5,64 ml di 0,1 M acido citrico, e 4,36 ml di 0,2 M Na_2HPO_4 .

La reazione è stata interrotta tramite l'aggiunta di 100 μl di H_2SO_4 al 5,3% e la densità ottica è stata letta a 492 nm.

RISULTATI

Mediante metodica ELISA validata come descritto precedentemente è stata valutata la capacità di rilevare in un fluido biologico piccole quantità di proteina clasterina glicosilata aumentata nelle cellule tumorali e rilasciata a livello extracellulare, sia nel lume intestinale sia nel sangue.

Nella figura 4 sono illustrati i risultati ottenuti mediante il saggio ed è possibile apprezzare un evidente e significativo aumento della proteina nel sopranatante di coltura delle cellule tumorali isolate ex vivo, rispetto alle cellule della mucosa sana dello stesso paziente. La specificità del test è fornita proprio dal confronto della presenza della proteina rilasciata dalle cellule sane e neoplastiche dello stesso paziente. Il terreno di coltura contenente gli stessi nutrienti esogeni è stato

utilizzato come normalizzatore. I risultati mostrano che il test è specifico.

In particolare, nella figura 4 è mostrato il diagramma che illustra i risultati del saggio ELISA concernenti la concentrazione di clasterina ($\mu\text{g/ml}$) rilasciata nel sopranatante di coltura dalle cellule della mucosa del colon normale e da cellule neoplastiche in coltura isolate ex vivo. E' stato impiegato il terreno di coltura completo utilizzato come controllo. Le cellule della mucosa sana (10×10^7 cellule) e le cellule neoplastiche del colon (10×10^7 cellule) sono state incubate per 2 giorni a 37°C in terreno completo ed il sopranatante di coltura è stato dosato con saggio ELISA.

Il kit diagnostico secondo la presente invenzione si propone quindi di determinare quantitativamente in modo assoluto e non relativo, specifico e selettivo, il livello di clasterina nei liquidi biologici, permettendo quindi una diagnosi tempestiva e non invasiva di eventuali neoplasie.

Nel caso specifico del carcinoma al colon retto, l'aumento dell'espressione della clasterina glicosilata nel citoplasma è stata correlata all'aggressività del tumore e al suo potenziale metastatico, per cui detto kit può essere impiegato

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
8

- Aronow BJ, Lund DS, Brown TL, Harmony JAK and Witte DP. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 725-729.
- Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M and Corti A. (2002). Oncogene 21, 4328-4334.
- Burkey BF, DeSilva HV and Harmony JA. (1991). J. Lipid Res., 32, 1039-1048.
- Fratelli M, Galli G, Minto M and Pasinetti GM. (1996). Biochim. Biophys. Acta 1311, 71-76.
- Ho SM, Leav I, Ghatak S, Merk F, Jagannathan VS and Mallery K. (1998). Am. J. Pathol., 153, 131-139.
- Humphreys DT, Carver JA, Easterbroock-Smith SB and Wilson MR. (1999). J. Biol. Chem., 274, 6875-6881.
- Lakins J, Bennett SA, Chen JH, Arnold JM, Morrissey C, Wong P, O'Sullivan J and Tenniswood M. (1998). J. Biol. Chem., 273, 27887-27895.
- Leskov KS, Klovov DY, Li J, Kinsella TJ and Boothman DA. (2003). J. Biol. Chem., 278, 11590-11600.

- Morrissey C, Lakins J, Moquin A, Hussain M, Tenniswood. (2001). J.Biochem.Biophys.Methods, 48,13-21.
- Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID and D'Apice AJ.(1988). J. Clin. Invest., 81, 1858-1864.
- O'Sullivan J, Whyte L, Drake J and Tenniswood M.(2003). Cell Death Differ. ,10, 914-927.
- Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli L. (2004). Oncogene, advance on line publication, 1-7.
- Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M and Petito CK.(2000). Am. J. Pathol., 157, 393-399.
- Wong P, Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Leger J, Wang C and Tenniswood M.(1993).J. Biol. Chem., 268, 5021-5031.
- Zhou W, Janulis L, Park II and Lee C.(2002). Life Sci., 72.
- Domanda di brevetto greco, No GR20020100196.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto



RM 2004 A 000098

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpi oligoclonali in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica l'epitopo antigenico di almeno un'isoforma della clasterina, detto epitopo essendo caratterizzato da una lunghezza della sequenza amminoacidica compresa tra 10 e 20 amminoacidi.

2. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 1, in cui detta almeno un'isoforma è citoplasmatica glicosilata o nucleare non glicosilata.

3. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni 1 e 2, in cui l'epitopo antigenico di detta isoforma nucleare non glicosilata comprende una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

e loro derivati.

4. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni 1 e 2, in cui l'epitopo antigenico di detta isoforma citoplasmatica glicosilata comprende una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEEAK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati.

5. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detti anticorpi sono marcati.

6. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 5, in cui gli anticorpi sono marcati con un fluorocromo, un isotopo radioattivo, un enzima, biotina o una sostanza chemioluminescente.

7. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui il fluorocromo è scelto dal gruppo che consiste in fluoresceina, ficoeritrina, rodamina, texas red, cumarina.

8. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui l'isotopo radioattivo è il ^{14}C o il ^3H .

9. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui la sostanza chemioluminescente è la luciferina.

10. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui l'enzima è scelto dal gruppo che consiste in perossidasi di rafano (HRP), fosfatasi alcalina.

11. Epitopi antigenici appartenenti ad almeno un'isoforma della clasterina comprendenti almeno una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEAK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati.

12. Metodo per la preparazione degli anticorpi oligoclonali, come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10, comprendente le seguenti fasi:

a) sintesi in fase solida di almeno uno degli epitopi antigenici come definiti nella rivendicazione 11;

b) coniugazione di detto almeno un epitopo antigenico con un carrier proteico atto a rendere immunogeno detto epitopo;

c) immunizzazione dell'animale con detto epitopo reso immunogeno, in adiuvante di Freund completo;

d) prelievo del siero da detto animale e purificazione degli anticorpi oligoclonali.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto carrier proteico è l'albumina di siero bovina.

REPUBBLICA ITALIANA
MINISTERO DELL'INTERNO
DIREZIONE REGIONALE
DI ROMA
UFFICIO REGIONALE
DELLA SANITA'



14. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 12 e 13, in cui detto animale è il coniglio.

15. Metodo immunologico per la rivelazione dei livelli di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente le seguenti fasi:

a) estrazione delle proteine da detto campione biologico;

b) incubazione in opportune condizioni di detto estratto proteico con almeno un anticorpo oligoclonale come definito nelle rivendicazioni da 1 a 10, in maniera da formare un complesso antigene-anticorpo; e

c) rivelazione qualitativa e quantitativa di detto complesso antigene-anticorpo.

16. Metodo immunologico secondo la rivendicazione 15, in cui detto campione biologico è scelto dal gruppo che consiste in sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor.

17. Metodo immunologico secondo ognuna delle rivendicazioni 15 e 16, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso

1986 MAR 20 10 10 AM

centrale, del sistema emolinfopoietico.

18. Metodo immunologico secondo ognuna delle rivendicazioni da 15 a 17, in cui la rivelazione della fase c) avviene mediante almeno una delle tecniche scelte dal gruppo che consiste in ELISA, Western Blot, RIA, immunoistochimica.

19. Kit diagnostico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente almeno uno degli anticorpi oligoclonali come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10.

20. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 19, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

21. Uso di almeno uno degli anticorpi oligoclonali come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10, per la determinazione qualitativa e quantitativa dei livelli di almeno un'isoforma di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità.

22. Uso secondo la rivendicazione 21, in cui la determinazione qualitativa e quantitativa viene effettuata mediante almeno una tecnica scelta dal

1989 01 24 10 00 00

gruppo che consiste in ELISA, RIA, immunoistochimica, Western Blot.

23. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 21 e 22, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale e del sistema emolinfopoietico.

24. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni da 21 a 23, in cui detto campione biologico è scelto dal gruppo che consiste in sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor.

Roma, 25 FEB. 2004

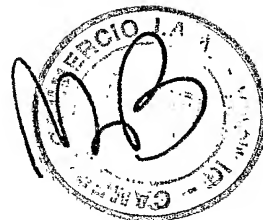
p.p. : Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

SG/IC

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto



ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

FIM 2004 A 000098

1/2

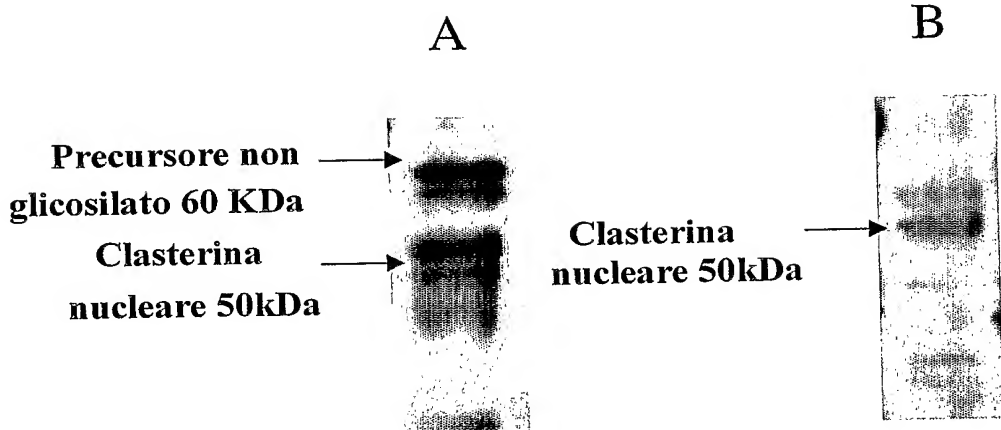


Fig. 1

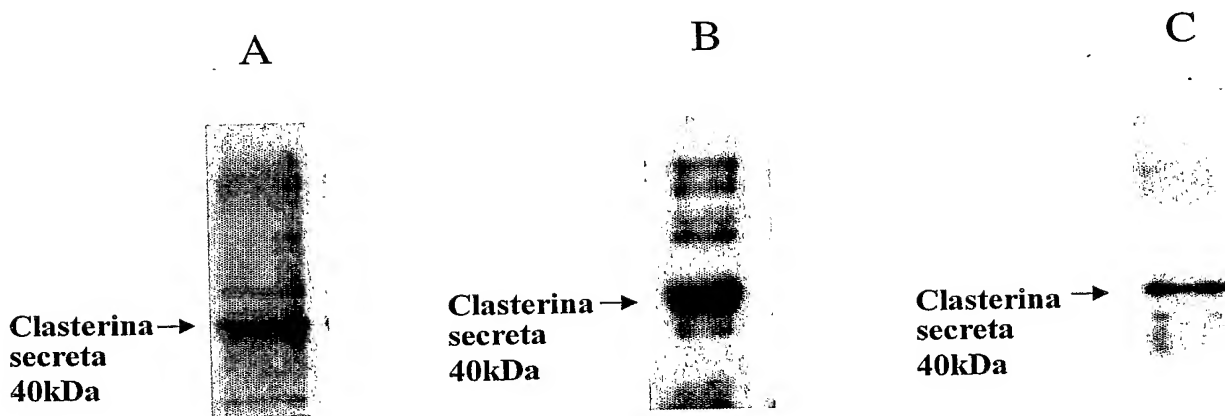


Fig. 2

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Serena Gitto



FIM 2004 A 000098

2/2

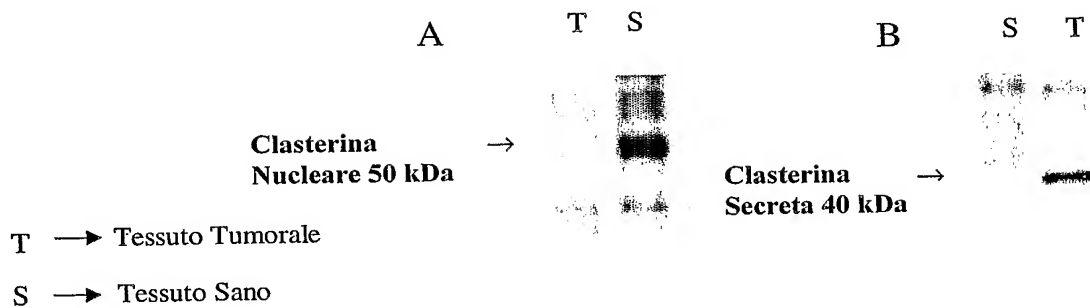


Fig. 3

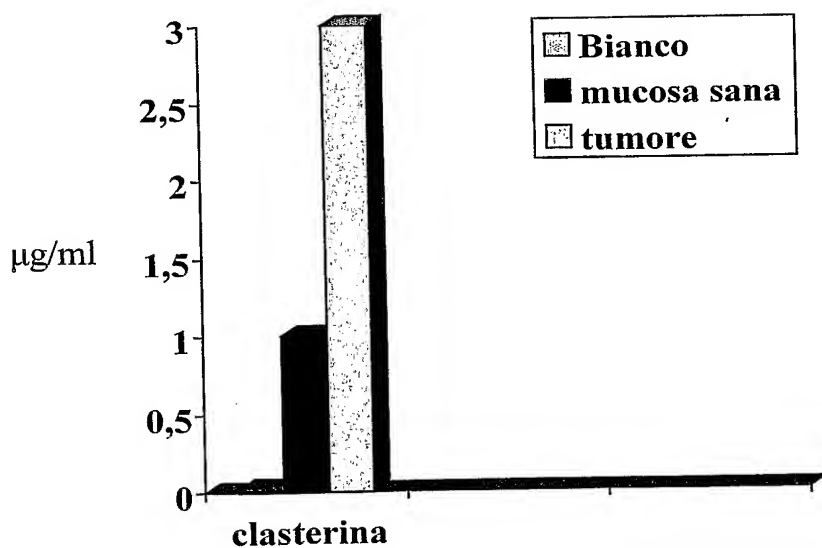


Fig. 4

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962B)

p.p.: Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Serena Gitto

